

0-783341

На правах рукописи



САЛАХОВ ИЛЬГИЗ АНЯСОВИЧ

**Унифицированные подходы к анализу метаболитов,
химиотерапевтических, аналгезирующих и противовоспалительных
лекарственных средств методом ВЭЖХ**

14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Казань – 2010

Работа выполнена в ГОУ ВПО
«Казанский государственный технологический университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Гармонов Сергей Юрьевич

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Будников Герман Константинович

доктор фармацевтических наук,
профессор Егорова Светлана Николаевна

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Российский университет
дружбы народов» (г. Москва)

Защита состоится «30» июня 2010 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 212.080.07 при Казанском государственном технологическом университете по адресу: 420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68, А-330.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Казанского государственного технологического университета.

Электронный вариант автореферата размещен на сайте Казанского государственного технологического университета <http://www.kstu.ru>.

Автореферат разослан «17» мая 2010 г.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000727206

Ученый секретарь
диссертационного совета

Г.Н. Нугуманова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Лекарственные средства (ЛС) с химиотерапевтическим, анальгезирующим, противовоспалительным и метаболическим действием составляют приоритетные фармакологические группы современных препаратов и находят широкое применение в медицинской практике для лечения различных заболеваний. В тоже время их полифункциональный состав, различные химические свойства, а также многокомпонентность лекарственных форм (ЛФ) требуют применения избирательных и чувствительных методов для контроля качества этих лекарственных веществ (ЛВ) в субстанциях, смесях синтеза и готовых ЛС.

Совершенствование принципов стандартизации и контроля качества ЛС, обеспечивающих их терапевтическую активность и безопасность применения, обуславливает разработку, унификацию и валидацию методов анализа ЛС на этапах их создания, производства и потребления. К таким методам в полной мере относится высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), которая за последние десятилетия во многом определила заметный прогресс в фармации и практической медицине.

ВЭЖХ как универсальный и высокочувствительный метод анализа, которому в ряде случаев нет альтернативы, позволяет одновременно осуществлять контроль за содержанием нескольких ЛВ, вспомогательных компонентов и возможных токсичных примесей в многокомпонентных ЛС, отличаясь при этом высокой точностью и воспроизводимостью.

Однако более широкое использование ВЭЖХ в практике рутинного фармацевтического анализа ограничено отсутствием унифицированных подходов к созданию методик анализа. В настоящее время для определения какого-либо ЛС и примесей в них применяются свои аналитические процедуры подготовки проб и методики ВЭЖХ анализа, которые в каждом конкретном случае предписывают использование разных колонок, подвижных фаз (ПФ) и детекторов. Очевидно, что эти обстоятельства приводят к необходимости каждый раз изменять параметры хроматографической системы и осуществлять ее калибровку, что, в конечном итоге, значительно увеличивает продолжительность всего анализа, требует высокой квалификации персонала и, наконец, существенно повышают стоимость анализа.

Один из возможных путей решения этой проблемы – разработка максимально унифицированных, экономичных и экспрессных методик подготовки пробы и хроматографических процедур. Реализация такого подхода, очевидно, позволит снизить расходы на проведение контроля и более широко внедрить ВЭЖХ в практику фармацевтического анализа. Это направление расширения возможностей контроля качества ЛС при использовании метода ВЭЖХ, безусловно, представляется нам важным и актуальным.

Диссертационная работа выполнялась при поддержке Гранта Президента Российской Федерации (МД-2523.2008.3).

Научным консультантом по работе являлась к.х.н. Ахметова Л.Т.

Цель работы состояла в создании комплекса унифицированных способов контроля качества метаболитов, химиотерапевтических, анальгезирующих, противовоспалительных лекарственных средств в многокомпонентных лекарственных и технологических смесях с использованием обращенно-фазной ВЭЖХ.

Для достижения цели решались следующие задачи:

- изучение условий хроматографического разделения и режимов градиентного элюирования, расчет и оценка параметров пригодности хроматографической системы и обоснование путей унификации методик определения ряда ЛВ химиотерапевтического, анальгезирующего, противовоспалительного и метаболитического действия;

- выявление факторов, обеспечивающих чувствительность и избирательность определений ЛВ и компонентов их синтеза (антибиотиков, водо- и жирорастворимых витаминов, производных карбоновых кислот и фенолов, хлорнитрозамещенных бензофураксанов), выбор рабочих условий детектирования исследуемых веществ в условиях обращенно-фазной ВЭЖХ при изократическом и градиентном режиме элюирования;

- оценка влияния компонентов анализируемой матрицы на регистрируемый в условиях ВЭЖХ аналитический сигнал;

- унификация процедур подготовки образцов лекарственных форм и технологических смесей синтеза для определения в них методом ВЭЖХ вышеперечисленных препаратов;

- определение метрологических характеристик разработанных способов для подтверждения их соответствия требованиям, принятым для фармацевтического анализа.

Научная новизна:

- установлены условия хроматографического разделения парацетамола, аскорбиновой и ацетилсалициловой кислот, анальгина, кофеина, дибазола, папаверина и 4-аминофенола в условиях обращенно-фазной ВЭЖХ, выявлены факторы повышения избирательности и чувствительности определения этих ЛВ в сложных по составу ЛФ андипала, цитрамона, антигриппина, антиангина и цитрапака;

- найдены и обоснованы рабочие условия высокочувствительного и избирательного определения смеси водорастворимых витаминов С, В₁, В₂, В₅, В₆, В₉, В₁₁, В₁₂, Р, РР, Н и жирорастворимых витаминов (А, Д₂, Е), а также витексина-2-рамнозида, рутина и гиперозида при использовании градиентного элюирования, подобраны условия пробоподготовки таблетированных и жидких ЛФ на их основе при высокопроизводительных аналитических определениях ЛВ;

- установлены условия хроматографического разделения близких по физико-химическим свойствам соединений 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофураксана, 4-нитро-5,7-дихлорбензофураксана и 5-нитро-4,6-дихлорбензофураксана, а также исходных компонентов их синтеза 1-нитро-2,4,6-трихлорбензола и 3,5-дихлор-2,4,6-тринитро-1-азидбензола; разработана методика количественного определения этих веществ в биологически активных смесях и показана возможность ее

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
им. Н. И. ЛОБАЧЕВСКОГО
КАЗАНСКОГО ГОС. УНИВЕРСИТЕТА

использования для контроля качества многокомпонентных ЛФ наружного применения и постадийного контроля синтеза хлорнитропроизводных бензофураксана;

- разработаны подходы по установлению подлинности, количественному одновременному определению ЛВ и примесей в смесях на основе напроксена и те-ноксикама методом ВЭЖХ и обосновано их использование для контроля качества новых гелеобразных ЛФ;

- предложена унифицированная ВЭЖХ методика для идентификации и определения цефазолина, цефатоксима, ципрофлоксацина, амоксициллина, натриевых солей ампициллина и бензилпенициллина, пирасетама, рибоксина, бифоназола, флуконазола, тербинафина, диклофенака-натрия и трамадола на колонке с обращенно-фазовым сорбентом типа "С18" при использовании двухкомпонентной ПФ, что существенно повышает экономичность всего метода.

Практическая значимость. Разработаны экспрессные и чувствительные методики одновременного и избирательного ВЭЖХ-определения ряда ЛВ химиотерапевтического, противовоспалительного, анальгезирующего действия, а также регуляторов обменных процессов в реакционных смесях, субстанциях и ЛФ.

Предложенные методические подходы могут быть использованы для расширения возможностей контроля качества ЛС и рекомендованы для применения в рамках проведения сертификации для обеспечения безопасности ЛС. Разработанные подходы позволяют повысить эффективность фармацевтического анализа путем использования одностадийных, высокопроизводительных, чувствительных и экспрессных ВЭЖХ методик ЛВ, значительно упростить и ускорить процессы пробоподготовки анализируемых образцов ЛФ.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования внедрены в ГУ «Центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств Республики Татарстан», в испытательной лаборатории ООО «Аналит продакт» (г. Санкт-Петербург) и в учебный процесс ГОУ ВПО «Казанский государственный технологический университет» в дисциплине «Контроль качества лекарственных препаратов».

На защиту выносятся:

- схема унифицируемого подхода и оптимизация хроматографического разделения ЛВ путем изменения рН ПФ, добавления модификаторов алкиламинов и додецилсульфата натрия;

- применение предложенного алгоритма анализа для установления условий определения примесей, вспомогательных веществ и действующих компонентов за одно ВЭЖХ определение в лекарственных и технологических смесях;

- результаты исследования по хроматографическому разделению антибиотиков, водо- и жирорастворимых витаминов, производных карбоновых кислот и фенолов, хлорнитрозамещенных бензофураксанов в условиях обращено-фазной ВЭЖХ;

- результаты изучения влияния состава и рН ПФ, условий градиентного элюирования, данных по оценке пригодности предложенных хроматографиче-

ских систем и свойств определяемого вещества на выбор условий избирательного и чувствительного детектирования ЛВ и компонентов их синтеза;

- обоснование и подбор рабочих условий высокочувствительного и избирательного определения парацетамола, аскорбиновой и ацетилсалициловой кислот, анальгина, кофеина, дибазола, папаверина, витаминов С, В₁, В₂, В₃, В₆, В₁₁, В₁₂, РР, А, Д₂, Е, витексина-2-рамнозида, рутина, гиперозида, а также нормируемых примесей с использованием спектрофотометрического и спектрофлуориметрического детектирования, новых способов пробоподготовки лекарственных форм на основе этих ЛВ для высокопроизводительного определения;

- схема проведения анализа сложных смесей на основе 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофураксана, 4-нитро-5,7-дихлорбензофураксана и 5-нитро-4,6-дихлорбензофураксана, а также компонентов их синтеза 1,3-динитро-2,4,6-трихлорбензола и 3,5-дихлор-2,4,6-тринитро-1-азидбензола;

- методики определения цефазолина, цефатоксима, ципрофлоксацина, амоксициллина, натриевых солей ампициллина и бензилпенициллина, парацетама, рибоксина, бифоназола, флуконазола, тербинафина, диклофенака-натрия, трамодала в субстанциях и лекарственных формах с применением ВЭЖХ.

- результаты исследования метрологических характеристик разработанных способов определения, полученные путем обработки экспериментального материала, подтверждающие их соответствие требованиям, принятым для фармацевтических методов анализа.

Апробация работы. Результаты работы и основные положения диссертации были доложены и обсуждены на XVIII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Москва, 2007), XII Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2007), XV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2008), III Всероссийской конференции «Аналитические приборы» (С.Петербург, 2008), Всероссийской конференции «Химический анализ» (Москва, 2008), II Международном форуме «Аналитика и аналитики» (Воронеж, 2008), Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии» (Самара, 2009); III Всероссийской конференции «Аналитика России» (Краснодар, 2009); I Всероссийской конференции «Современные методы химико-аналитического контроля фармацевтической продукции» (Москва, 2009), 65-ой Всероссийской конференции по фармации и фармакологии (Пятигорск, 2010).

Публикации: по материалам диссертации опубликовано 6 статей и 9 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов, заключения, указателя литературы, включающего 224 источника. Работа изложена на 173 страницах машинописного текста, иллюстрирована 68 рисунками, 74 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе рассмотрены современное состояние и перспективы развития ВЭЖХ ЛВ. Обсуждены подходы по повышению избирательности и чувствительности определений ЛВ, а также расширения возможностей ВЭЖХ в фармацевтическом анализе.

Во второй главе дано описание объектов, методов и средств исследования и методик проведения анализа. В работе применяли жидкостные хроматографы: LC-20 фирмы "Schimadzu" (Япония) с диодно-матричным и флуоресцентным детекторами; SERIES 200 фирмы Perkin Elmer (США) с УФ детектором.

Использовали спектрофотометр SPECORD 40 (AnalytikJena, Германия), рН-метр 211 (Hanna, Румыния), центрифугу Minispin Plus (Eppendorf, Германия), ультразвуковую ванну L-0,16/18 (Россия), установку для получения сверхчистой воды Simplicity Millipor (Франция).

Использованы ЛС промышленного изготовления различных производителей. Образцы субстанций и ЛФ хлорнитробензофуороканов предоставлены д.х.н., проф. Юсуповой Л.М. Гели напроксена и теноксикама предоставлены д.фарм.н., доц. Насыбуллиной Н.М. В качестве стандартов применяли стандартные образцы USP, BP, фирм Fluka, Sigma, Aldrich, Extrasynthese и субстанции ЛВ, отвечающие всем требованиям нормативной документации (НД).

В третьей главе приведены результаты по выбору унифицированных рабочих условий определения ЛВ с химиотерапевтической, анальгезирующей, противовоспалительной и метаболической активностью.

Для поиска оптимальных условий разделения и обоснования выбора унифицируемой ПФ требовалось оценить хроматографическое поведение этих ЛВ с учетом активности незащищенных силанолов сорбента (pK_a 3,5) в зависимости от изменения диапазона рН ПФ, ограниченного для большинства сорбентов интервалом от 2 до 7,5. При этом можно выделить ЛВ с слабыми ($pK_a < 7$; кофеин, 4-аминофенол, гуанин, ацикловир, теноксикам, папаверин, нифедипин, рибофлавин, пиридоксин, фолиевая кислота, никотинамид), средними ($pK_a > 7$; ципрофлоксацин, лидокаин, тетракаин) и сильными ($pK_a > 9$; хлорфенирамин, хлоргексидин, бензетония хлорид, трамадол, фенилэфрин) основными свойствами и слабыми ($pK_a > 4$; аскорбиновая кислота, парацетамол, метилпарабен, пропилпарабен, напроксен, фенобарбитал, диклофенак, бензойная кислота, биотин, рутин) и средними ($pK_a > 2$; ацетилсалициловая, салициловая кислоты, амоксициллин, бензилпенициллин, цефазолин, цефотаксим) кислотными свойствами. Было установлено, что использование рН для контроля состояния ионизации аналита в ОФ условиях ВЭЖХ является эффективным приемом для изменения селективности разделения. Ионизированные функциональные группы имеют большую полярность, что приводит к уменьшению удерживания, и обладают ионным взаимодействием с незащищенными и активными силаноломи сорбента, что влияет на форму пика и его воспроизводимость. В качестве примера на рис. 1,2 представлено хроматографическое поведение ЛВ с кислотными и основными свойствами.

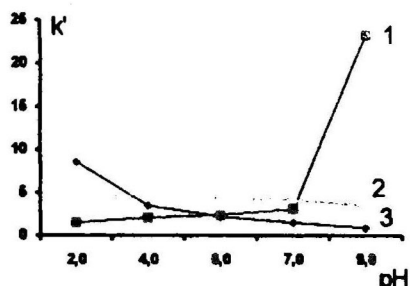


Рис. 1. Зависимость фактора удерживания тетракаина (1), пропилпарабена (2), салициловой кислоты (3) от pH ПФ. ХТетра RP18. Элюенты А: 0,02М Na_2HPO_4 , H_3PO_4 ; Б: ацетонитрил, А/Б=72/28 (об.,%). 40°C

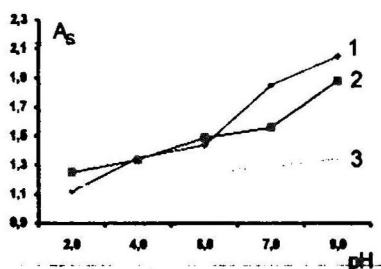


Рис. 2. Зависимость коэффициента асимметрии пика салициловой кислоты (1), тетракаина (2), пропилпарабена (3) от pH ПФ. Условия - см. на рис. 1.

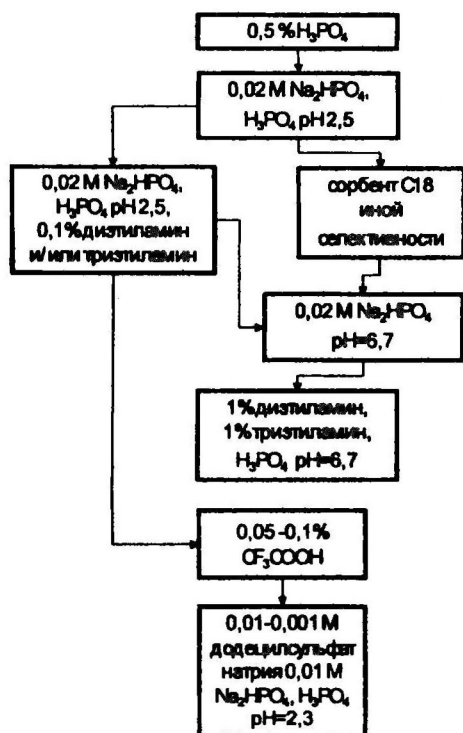


Рис. 3. Схема унифицируемого подхода

В диапазоне pH ПФ вблизи значений $pK_{\text{ЛВ}}$ присутствуют в растворе одновременно в нейтральной и ионизированной форме. Силанолы сорбента в нейтральной среде ионизированы, что приводит к увеличению их взаимодействия с полярными функциональными группами, приводя к образованию сильного хвостового фактора и снижению эффективности колонки. При pH ниже их pK_a на 1-1,5 ед. они находятся в нейтральном состоянии, поэтому подкисление ПФ является общим подходом по установлению вторичных взаимодействий.

Учитывая рабочий диапазон колонки, pK кислот и оснований, свойств свободных силанолов сорбента, ПФ с pH 2 - 3 является наиболее приемлемой для создания стартовых унифицируемых условий определения исследованных ЛВ (рис. 3). Для создания этих значений pH исследовали ПФ на основе фосфорной, муравьиной, уксусной, трифторуксусной кислот и буферных растворов на их основе.

При разработке новых методик удобство унифицированного элюента заключается в предоставлении стартовых условий анализа, экономии времени, быстрой адаптации хроматографической системы при смене объекта анализа. В растворе фосфатного буфера и фосфорной кислоты нам удалось получить разделение компонентов с наиболее приемлемой селективностью. Так, изучение различных по своим хроматографическим свойствам ЛВ хлорфенирамина малеата, хлоргексидина диацетата, бензэтония хлорида, салициловой кислоты и кофеина выявило возможность их разделения на колонках с различной селективностью гидрофобных фаз. При этом большое влияние на разделение оказывают свойства гидрофобного сорбента (рис. 4,5).

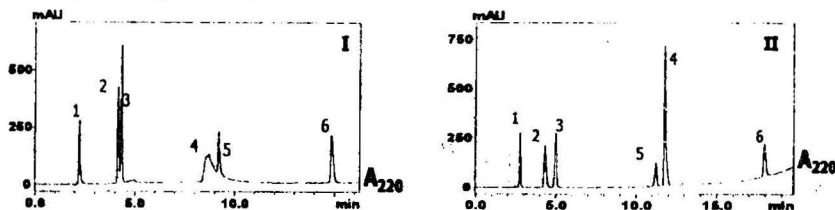


Рис. 4. Хроматограммы смеси (мкг/мл): малеат – 1 (60), хлорфенирамин – 2 (60), кофеин – 3 (46), хлоргексидин – 4 (78), салициловая кислота – 5 (64), бензэтония хлорид – 6 (50) при градиенте ПФ: А - 0,5% H_3PO_4 , Б – ацетонитрил. Symmetry (I) C18; Discovery RP Amide (II). 40 °C

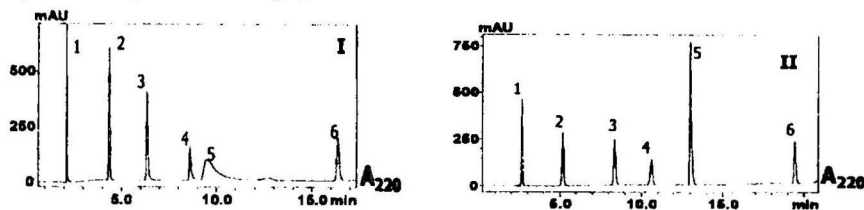


Рис. 5. Хроматограммы смеси (мкг/мл): малеат – 1 (60), кофеин – 2 (46), хлорфенирамин – 3 (60), салициловая кислота – 4 (64), хлоргексидин – 5 (78), бензэтония хлорид – 6 (50) при градиенте ПФ: А - 0.02 M Na_2HPO_4 , H_3PO_4 pH 2,5, Б – ацетонитрил. Symmetry (I) C18; Discovery RP Amide (II) C16. 40 °C

В случае неудовлетворительного разделения соединений с третичным атомом азота в ПФ фосфатного буфера возможно изменение селективности разделения при использовании трифторуксусной кислоты. В этом случае удалось достигнуть разделения ЛВ с близкими спектральными и элюационными характеристиками, как сахаринат натрия и хлорфенирамина малеат (рис. 6). Коэффициенты емкости и асимметрии пиков зависят от концентрации модификатора в ПФ (рис. 7).

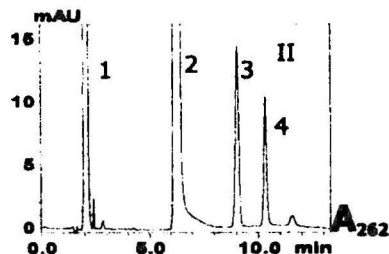
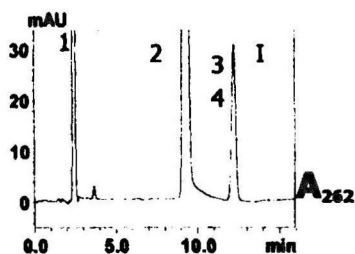


Рис. 6. Хроматограмма смеси (мкг/мл): аскорбиновая кислота – 1 (50), парацетамол – 2 (250), сахаринат натрия – 3 (10), хлорфенирамин – 4 (12) ПФ: (I) А 0,02М Na₂HPO₄, H₃PO₄ pH 2.5; Б ацетонитрил; (II) А 0,025% CF₃COOH, 0,25% H₃PO₄, Б CH₃CN, градиент Б 5→18 за 9 мин, 1,0 мл/мин. Symmetry C18. 40 °C

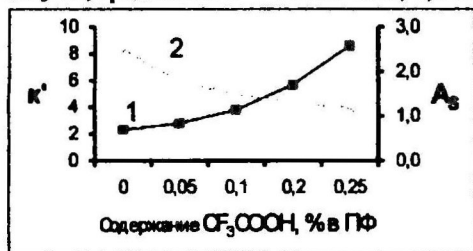


Рис. 7. Зависимость коэффициента емкости (1) и ассиметрии пика (2) хлорфенирамина от концентрации модификатора трифторуксусной кислоты в ПФ 0,2 % H₃PO₄ – ацетонитрил 95:5 (об., %) на колонке Symmetry C18. Температура 40°C

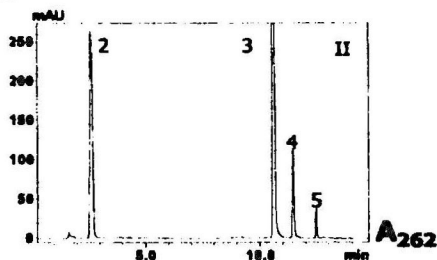
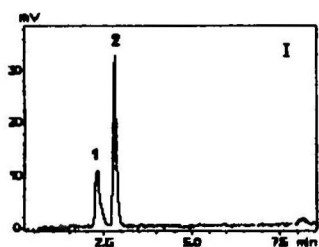


Рис. 8. Хроматограмма антигриппина (мкг/мл): 4-аминофенол – 1 (0,25), аскорбиновая кислота – 2 (100), парацетамол – 3 (500), сахаринат натрия – 4 (60), хлорфенирамина малеат – 5 (6). Длина волны возбуждения 260 нм, эмиссии 340 нм (I), длина волны 262 нм в (II) ПФ: А 0,05% CF₃COOH, Б ацетонитрил, 0,2% Б 3 мин, градиент Б 0,2→55 за 10 мин, 55 % Б 2 мин. Symmetry C18. 30 °C

Возможности по унификации анализа можно продемонстрировать на примере многокомпонентных ЛФ антигриппина. В них содержание компонентов сильно различается и они обладают близкими элюационными характеристиками на гидрофобных фазах. Из-за этого в НД на ЛФ антигриппина применяют несколько элюирующих смесей для каждого соединения. Нами предложены условия одно-

временного хроматографического определения действующих, вспомогательных компонентов и нормируемых примесей (рис. 8). При указанных рабочих условиях хорошо воспроизводимые градуировочные зависимости площади пика от содержания аналита записываются в виде уравнений:

для парацетамола $S = 95417 C_X (\text{мкг/мл}) + 9805$ ($r = 0,9997$, $n = 15$);

для аскорбиновой кислоты $S = 22650 C_X (\text{мкг/мл}) + 1584$ ($r = 0,9996$, $n = 12$);

для хлорфенирамина малеата $S = 23927 C_X (\text{мкг/мл}) - 1793$ ($r = 0,9997$, $n = 14$);

для сахарината натрия $S = 10445 C_X (\text{мкг/мл}) - 1008$ ($r = 0,9995$, $n = 14$).

Предварительно установлено, что вспомогательные вещества, входящие в состав таблеток, определениям не мешают. Возможность ВЭЖХ определения проверена на готовых ЛФ (табл. 1).

Таблица 1. Результаты анализа шипучих таблеток антигриппина промышленной серии 02060607 ($n=5$, $P = 0,95$)

Компоненты	Норма по НД, мг	X_{cp}	S	S_x	ΔX_{cp}	$\epsilon_{cp}, \%$
Парацетамол	237,5-262,5	248,3	1,92	0,86	2,38	0,96
Хлорфенирамина малеат	2,7-3,3	3,06	0,052	0,023	0,0646	2,11
Аскорбиновая кислота	46,25-53,75	48,86	1,42	0,64	1,77	3,61
Сахаринат натрия	30	29,21	0,89	0,40	1,11	3,7
4-Аминофенол	не более 0,25	$6 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$4,9 \cdot 10^{-5}$	8,28

С использованием унифицированного подхода показана возможность за один хроматографический цикл проводить определение наряду с действующим веществом и нормируемых примесей. В качестве примера приведены хроматограммы трамадола и рибоксина (рис. 9, 10).



Рис. 9. Хроматограмма компонентов таблеток трамадола (2) и примеси цис-трамадола – 0,16 мкг/мл (1). ПФ: А 0.02М Na₂HPO₄, H₃PO₄ pH 2,5, Б - ацетонитрил, А/Б=25/75. Pecosphere C18. 30 °C

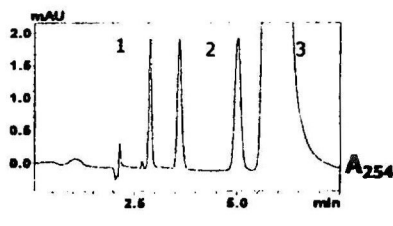


Рис. 10. Хроматограмма раствора рибоксина: гипоксантин – 0,2 мкг/мл (1), гуанозин – 0,3 мкг/мл (2), рибоксин – 200 мкг/мл (3). ПФ: 0,5% H₃PO₄. Discovery RP Amide C16. 30 °C

В случае 4-аминофенола (АФ) не удалось получить приемлемого разделения, применяя унифицируемую ПФ на сорбенте C18. Содержание АФ нормируется во всех ЛФ, содержащих парацетамол и определение осложняется фоном матрицы и малыми его содержаниями (0,05% - 0,5%). В этом случае реализован ион-парный механизм разделения при использовании додецилсульфата натрия (ДДС). Обладая более высокой удерживающей способностью чем, гексил- или октилсульфонат, он позволяет при высоком содержании модификатора получать приемлемые времена удерживания АФ, из-за чего остальные компоненты элюируются вместе с пиком перераспределения, не мешая определению примеси. Удерживание соединений с основными свойствами, в частности фенирамина, при этом значительно возрастает, что позволяет достоверно отделять все компоненты смеси от примеси АФ (рис. 11). Наряду со спектрофотометрическим возможно использование более чувствительного флуоресцентного детектора (E_{ex} 260, E_{em} 340 нм). Градуировочные зависимости площади пика от содержания АФ записываются в виде уравнений:

$$S = 18089 C_X (\text{мкг/мл}) + 630 \quad (r = 0,9998, n = 25), 272 \text{ нм, ПрО } 0,306 \text{ мкг/мл;}$$

$$S = 319376 C_X (\text{мкг/мл}) + 1003 \quad (r = 0,9999, n = 21), \text{ПрО } 0,04 \text{ мкг/мл.}$$

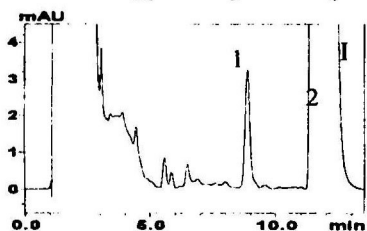


Рис. 11. Хроматограмма компонентов таблеток терафлю: 4-аминофенол - 2,5 мкг/мл (1), фенирамина малеат (2). ПФ: 0,01М $C_{12}H_{25}NaSO_4$, 0,01М Na_2HPO_4 , H_3PO_4 pH 2,2, Б - ацетонитрил, А/Б=70/30. Symmetry C18. 40 °C

Определение винпоцетина проведено на основе ПФ алкиламинов при нейтральном значении pH в изократическом режиме, при этом удалось получить полное разделение всех примесей и компонентов с хорошей пригодностью хроматографической системы (рис. 12).

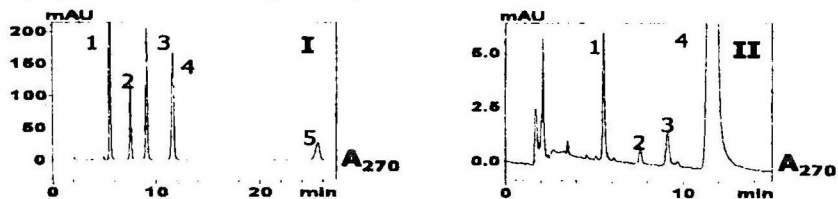


Рис. 12. Хроматограмма винпоцетина (I): этилвинкаминат - 200 мкг/мл (1), гидроксимино основание - 50 мкг/мл (2), аповинкамин - 50 мкг/мл (3), винпоцетин - 50 мкг/мл (4), α -этил-транс-винпоцетин - 50 мкг/мл (5), субстанции винпоцетина (II): этилвинкаминат - 1,55 мкг/мл (1), гидроксиминооснование - 0,19 мкг/мл (2), аповинкамин - 0,40 мкг/мл (3), винпоцетин - 200 мкг/мл (4). ПФ: А - 1% ДЭА, 1% ТЭА, H_3PO_4 pH=6,7, Б - ацетонитрил, А/Б= 30/70. Discovery HS C18. 30°

Применение унифицируемой ПФ на основе фосфорной кислоты позволило разделить наряду с действующим веществом таких активных соединений, как консерванты и предложить способ изократического определения действующих веществ и биологически активных вспомогательных веществ в новых ЛФ - 1% гелях напроксена и теноксикама. Для ЛФ 1% геля теноксикама использовали градиентное элюирование (рис. 13, 14).

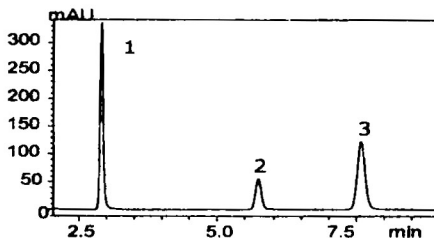


Рис. 13. Хроматограмма компонентов 1% геля теноксикама (мкг/мл): теноксикам 1 (50), метилпарабен 2 (15), пропилпарабен 3 (5). ПФ: А - 0,5% H_3PO_4 , Б - ацетонитрил - метанол (1:1 об.), А:Б=45:55. λ 255 нм. Symmetry C18.

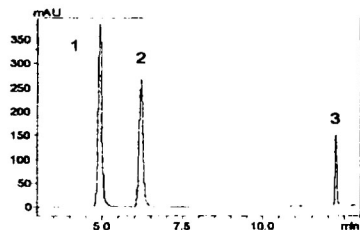


Рис. 14. Хроматограмма компонентов 1% геля напроксена (мкг/мл): метилпарабен 1 (15), пропилпарабен 2 (5), напроксен 3 (50). ПФ: А - 0,5% H_3PO_4 , Б - ацетонитрил - метанол (1:1 об.) А:Б=45:55. λ 255 нм. Symmetry C18.

ВЭЖХ определение по предложенному алгоритму удалось осуществить для субстанций и ЛФ диклофенака, амоксициллина, фунготербина, бензилпенициллина натриевой соли, цефазолина натриевой соли, пирацетама, цефатоксима натриевой соли, андипала, азинокса, суппозиторий биопроста, цитрамона, гриппофлю, боярышника. Некоторые примеры представлены на рис. 15, 16.

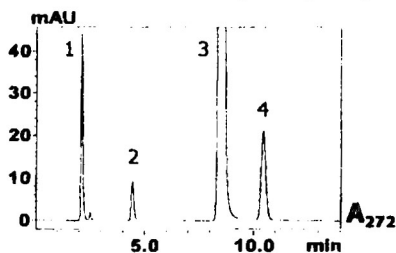


Рис. 15. Хроматограмма компонентов таблеток гриппофлю (мкг/мл): аскорбиновая кислота - 1 (40), фенирэфрин - 2 (8), парацетамол - 3 (520), фенирамин - 4 (16). ПФ: А - 0,1% CF_3COOH , Б - ацетонитрил, град. Б 1 \rightarrow 7% за 10 мин, 7% Б 2,5 мин. Xterra C18

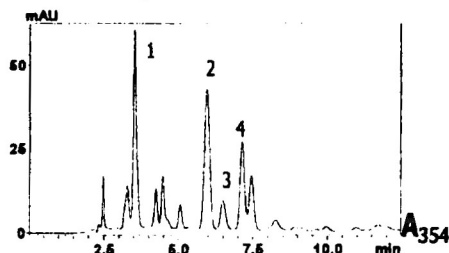


Рис. 16. Хроматограмма компонентов таблеток боярышника (мкг/мл): хлорогеновая кислота - 1 (18), витексин - 2 (18,3), рутин - 3 (2,8), гиперозид - 4 (9,5) в ПФ А - Na_2HPO_4 , H_3PO_4 pH 2,5, Б - смесь ацетонитрил-метанол (1:1 об.), А:Б=70:30. Discovery RP Amide C16

В четвертой главе представлены результаты по хроматографическому исследованию и унификации определения витаминов. Существующие методики анализа поливитаминных препаратов в большинстве своем используют ион-парные реагенты (ИПР) на основе алкилсульфонатов с алкильными цепями C_6-C_8 в кислой среде ПФ. В этом случае наряду с преимуществами в виде повышения эффективности разделения и улучшения формы пика имеются недостатки. К ним относятся высокая стоимость, сложная подготовка элюента, длительное уравнивание колонки, негативное влияние ИПР на хроматографическую колонку за счет необратимой сорбции модификатора, а также сложность использования градиентного режима элюирования.

Ряд витаминов являются высокополярными соединениями. На их удерживание и разделение большое значение оказывает pH ПФ и вид сорбента. В кислой среде унифицируемой ПФ витамины С, В₁, В₆, РР имеют низкие значения коэффициента емкости и недостаточную степень разделения пар витаминов В₁ и С; РР и В₁; РР и С на различных сорбентах. Приемлемую для количественного определения степень разделения гидрофильных витаминов удалось получить лишь на колонке «Discovery RP Amide C16» при кислом значении pH ПФ (рис. 17).

Изменяя значения pH от 4,0 до 6,9 в ПФ на основе фосфатного буфера было проведено изучение хроматографических характеристик разделения витаминов С, В₁, В₆, РР, В₅, В₂ на сорбенте «Symmetry C18» (рис. 18). Оптимального разделения всей группы витаминов удалось добиться лишь при pH 6,7. Однако пик тиамина при этом обладает недостаточной симметрией и нестабильным временем удерживания. Для смещения времени удерживания тиамина из зоны элюирования пиридоксина и никотинамида в ПФ добавлен ДДС в концентрации 0,001 М в нейтральной среде. В итоге реализована экспрессная методика анализа витаминов С, В₅, В₆, РР, В₂.

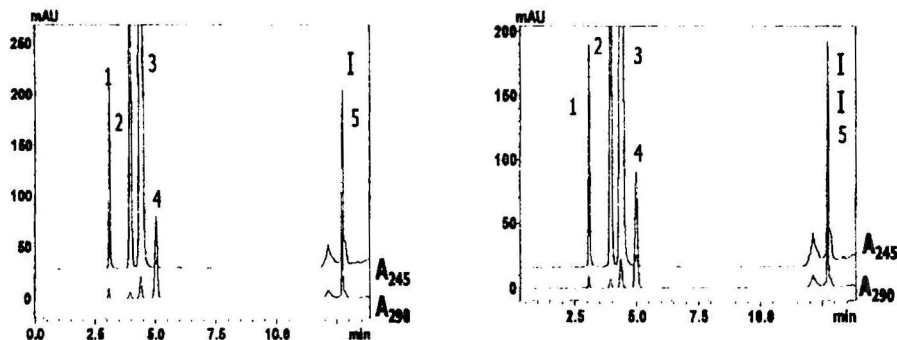


Рис. 17. Хроматограммы смеси витаминов (I) и в таблетках «Гексавит» (II): В₁ - 10 мкг/мл (1), РР - 75 мкг/мл (2), С - 350 мкг/мл (3), В₆ - 10 мкг/мл (4), В₂ - 10 мкг/мл (5). ПФ: А - 0,02М Na₂HPO₄ - H₃PO₄, pH 2,3, Б - ацетонитрил, 0,2% Б 5 мин, градиент Б 0,2→70% за 3 мин, 70% Б 6 мин. Discovery RP Amide C16. 35 °С.

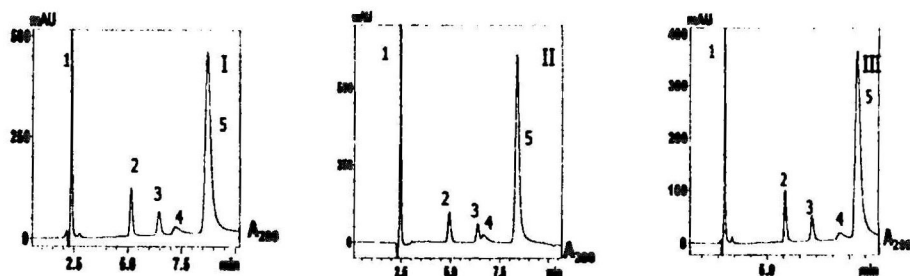


Рис. 18. Хроматограммы смеси витаминов: витамин С - 300 мкг/мл (1), B_3 - 30 мкг/мл (2), B_6 - 10 мкг/мл (3), B_1 - 7 мкг/мл (4), РР - 90 мкг/мл (5). ПФ А: 0,02М Na_2HPO_4 - H_3PO_4 , pH 6,7 (I); pH 6,5 (II); pH 6,9 (III), Б: ацетонитрил - метанол (1:1 об.), 2% Б 10 мин, градиент Б 2→30% за 8 мин. Symmetry C18. 40 °С

При дальнейшем улучшении элюационных свойств тиамина и разделении сложной смеси витаминов обратили внимание на тот факт, что добавление модификаторов триэтиламина (ТЭА) и диэтиламина (ДЭА) в больших количествах в нейтральной среде аналогично действию ИПР. По этой причине предложен элюент на основе относительно высоких концентраций этих модификаторов (на уровне 1 %) при нейтральном значении pH ПФ (табл. 2). В результате улучшилась симметрия и воспроизводимость времен удерживания пика тиамина, изменилась селективность разделения для витамина B_3 , который элюируется после витаминов С; B_1 ; B_6 ; РР (рис. 19).

Таблица 2. Режим градиентного элюирования при разделении витаминов с добавками модификаторов ПФ (скорость потока 1 мл/мин)

Время, мин	Элюент А: 1% ДЭА, 1% ТЭА, H_3PO_4 , pH=6,7; %	Элюент Б: CH_3CN , %	Элюент В: метанол, %
0-5	98	0	2
5-12	98→90	0→1	2→9
12-14	90→84	1→5	9→11
14-19	84→70	5→15	11→15
19-25	70	15	15
25-35	98	0	2

Способ характеризуется хорошими параметрами разделения и с успехом апробирован на ЛФ различных производителей. Его характеристики отличаются хорошей устойчивостью разделения и порядком элюирования наиболее проблемных гидрофильных витаминов на различных марках сорбентов (Symmetry C18, Luna C18 и др.).

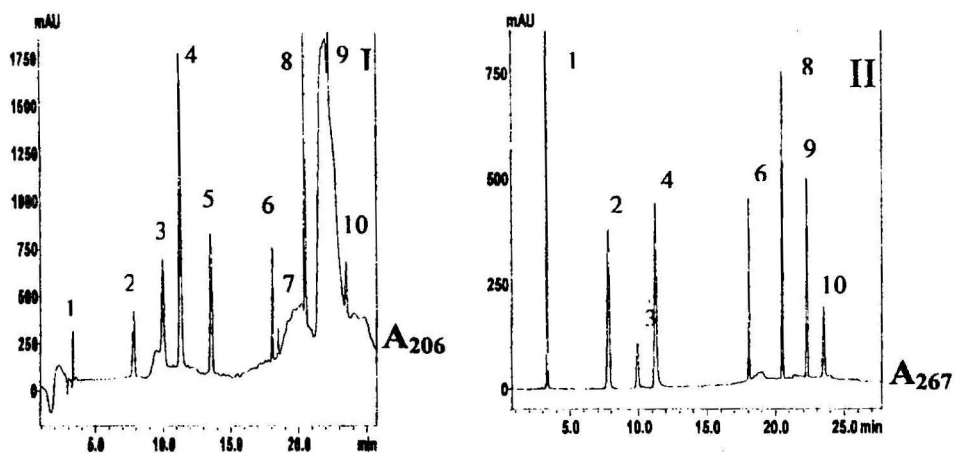


Рис. 19. Хроматограмма смеси витаминов (I – 206 нм, II – 267 нм, мкг/мл): С – 1 (100), В₁– 2 (100), В₆– 3 (75), РР– 4 (100), В₅– 5 (250), В_с– 6 (50), Н –7 (100), В₁₂– 8 (100), В₂– 9 (20), Р –10 (30). Discovery HS C18. Условия см. табл. 2.

Характеристики предложенного подхода подтверждены хорошими метрологическими и валидационными параметрами (табл. 3). Найденные условия позволяют проводить определение 10 водорастворимых витаминов в различных препаратах (табл. 4).

Таблица 3. Пригодность хроматографической системы для анализа витаминов в нейтральной среде (n=10, длина волны 206 нм)

Вита- мины	Время удер- жив., мин	Сим- мет- рия пика	Разделе- ние (разреше- ние между пиками)	Разделе- ние (се- лектив- ность)	Фак- тор удер- жив.	RSD% $t_{уд}$	RSD % S пика
С	3,30	1,574	-	0,000	0,652	0,28	2,31
В ₁	7,79	1,059	26,53	4,447	2,899	0,74	0,65
В ₆	9,93	0,976	8,41	1,368	3,966	0,82	0,43
РР	11,22	1,294	5,38	1,164	4,614	0,29	0,77
В ₅	13,50	1,397	9,21	1,247	5,733	0,30	0,47
В _с	18,05	1,068	24,93	1,395	8,026	0,95	0,33
Н	18,50	0,991	3,86	1,030	8,250	0,89	0,86
В ₁₂	20,51	1,041	15,01	1,130	9,256	0,96	0,95
В ₂	22,26	1,101	11,40	1,095	10,134	0,90	0,68
Р	23,51	1,135	8,31	1,066	10,756	0,72	0,33

Таблица 4. Характеристики методики анализа гидрофильных витаминов в нейтральной ПФ на основе алкиламинов

Витамины	Оптимальная длина волны, нм	Диапазон мкг/мл	Наклон	b	r ²
C	300	150 - 500	5261	1653	0,9978
B ₅	206	5 - 50	12608	1911	0,9994
B ₆	324	5 - 100	53085	2032	0,9994
B ₁	267	5 - 100	29581	1057	0,9992
B ₂	445	5 - 100	45803	1412	0,9997
PP	262	25 - 250	33258	1921	0,9993
P	362	10 - 150	31300	1749	0,9998

Хотя получено разделение для всех компонентов, витамины B₆, H, B₁₂ не могут быть определены вместе с остальными, так как они содержатся в значительно меньших содержаниях в ЛФ и требуют иную подготовку пробы. Обычно эти витамины определяются трудоемкими и неточными микробиологическими методами. Было показано, что хроматографическое разделение витаминов B₆ и H возможно в ПФ на основе фосфатного буфера. Определение витамина B₁₂ реализовано в ПФ на основе алкиламинов в нейтральной среде за счет его селективного поглощения в длинноволновой области спектра при 361 нм совместно с определением остальных компонентов препарата «Мильгамма», несмотря на его низкое содержание витамина B₁₂ в образце. Используя диодноматричное детектирование с реализована простая методика одновременного количественного определения жирорастворимых витаминов, несмотря на то что содержание витамина D₂ и E отличается в 3000 раз (рис. 20).

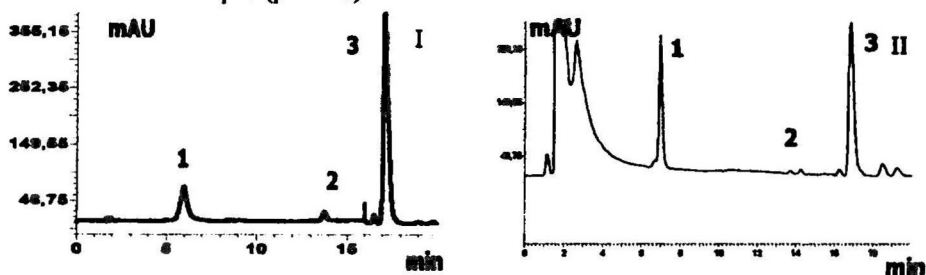


Рис. 20. Хроматограммы витаминов в смеси (I) и таблетках, покрытых оболочкой «Компливит мама для беременных и кормящих женщин» (II): А - 90,8 мкг/мл (1), D₂ - 1 мкг/мл (2), Е - 3200 мкг/мл (3). ПФ А - ацетонитрил: метанол 50:50 по объему, Б - вода, градиент А 98→100% за 12 мин, 100% А 8 мин. ДВД 268 нм - 16 мин., 289 нм - 4 мин. Pecosphere C18. 22 °C

В главе 5 проведено изучение хроматографического разделения биологически-активных смесей на основе хлорнитропроизводных бензофураксана. Эти смеси используются в ветеринарии как эффективные антибактериальные, противогрибковые и акарицидные средства. С целью дальнейшего создания ЛФ на их основе и оптимизации технологии производства исследовано хроматографическое поведение близких по физико-химическим свойствам 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофураксана (4,6-ДН-5,7-ДХБФО), 4-нитро-5,7-дихлорбензофураксана (4-Н-5,7-ДХБФО) и 5-нитро-4,6-дихлорбензофураксана (5-Н-4,6-ДХБФО) в ОФ ВЭЖХ на различных гидрофобных сорбентах (рис. 21).

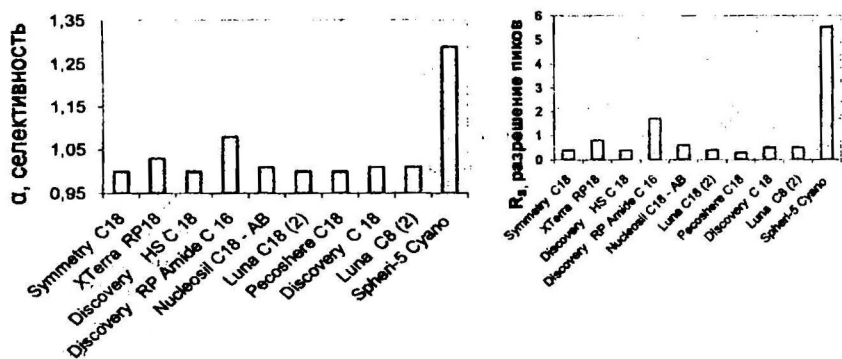


Рис. 21. Зависимость селективности разделения и разрешения пиков 4,6-ДН-5,7-ДХБФО и 5-Н-4,6-ДХБФО в ПФ 0,05% CF_3COOH – ацетонитрил от марки сорбента

Наличие дополнительной электроноакцепторной нитрогруппы в случае 4,6-ДН-5,7-ДХБФО предполагает более сильные взаимодействия на сорбенте с привитыми нитрильными группами по сравнению с моонитрозамещенными производными. Как и ожидалось, это привело к увеличению времени удерживания и повышению эффективности разделения этих соединений в смеси (рис. 22).

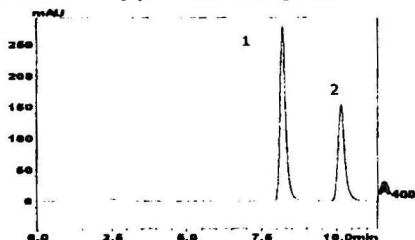


Рис. 22. Хроматограмма 5-Н-4,6-ДХБФО - 100 мкг/мл (1) и 4,6-ДН-5,7-ДХБФО - 100 мкг/мл (2). Колонка: Spheri-5 CYANO. ПФ А: 0,05% CF_3COOH ; Б: ацетонитрил, А/Б 60/40. 25°C

В тоже время при использовании гидрофобной фазы с измененной селективностью Amide C16 удалось разделить целевые компоненты и возможные техно-

логические примеси, используя изократический режим элюирования с приемлемым для количественного определения временем анализа (рис. 23). Так, определение примеси 1,3-динитро-2,4,6-трихлорбензола (ДНТХБ) позволяет оценивать чистоту получаемых продуктов и контролировать протекание процесса нитрования. Наличие 3,5-дихлор-2,4,6-тринитро-1-азидбензола (ДХТНАБ) в конечных продуктах указывает на нарушение стадии термоциклизации полинитродихлорфенилазидов, что приводит к снижению выхода хлорнитропроизводных бензофуроксанов.

Данные по пригодности хроматографической системы для определения производных хлорнитробензофуроксанов приведены в таблице 5. Характеристики методики ВЭЖХ определения компонентов синтеза производных бензофуроксанов приведены в таблице 6. При использовании разработанной методики возможно определение компонентов ЛФ хлорнитрозамещенных бензофуроксана на основе физического смешивания компонентов и на основе смеси, полученной в результате синтеза (табл. 7).

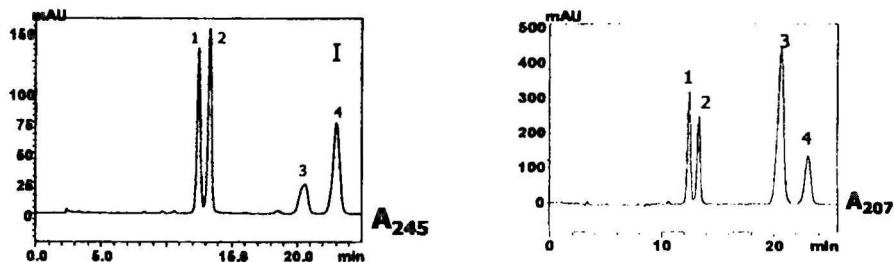


Рис. 23. Хроматограмма разделения 5-Н-4,6-ДХБФО (1), 4,6-ДН-5,7-ДХБФО (2), ДНТХБ (3), ДХТНАБ (4). Концентрация компонентов 40 мкг/мл. Discovery RP Amide C16. λ 245 нм (I), 207 нм (II). ПФ А: 0,05 % H_3PO_4 ; Б: ацетонитрил, В: метанол, А: Б: В = 51:34:15. 50°C

Таблица 5. Пригодность хроматографических систем анализа производных бензофуроксанов ($n=10$, длина волны 245 нм)

Соединение	$t_{\text{уд}}$ мин	Сим- мет- рия пика	Число т.т	Раз- ре- ше- ние	Козфи- циент селек- тивно- сти	Фак- тор удер- жи- вания	RSD % t вы- хода пика	RSD % S пика
5-Н-4,6-ДХБФО	12,5	1,08	10866	-	0,00	5,24	0,29	0,33
4,6-ДН-5,7- ДХБФО	13,3	1,11	10966	1,71	1,08	5,66	0,27	0,35
ДНТХБ	20,6	0,91	5148	8,83	1,65	9,32	0,34	0,45
ДХТНАБ	23,1	0,96	8696	2,28	1,13	10,5	0,37	0,42

**Таблица 6. Аналитические характеристики методики
ВЭЖХ анализа производных бензофуроксанов**

Компонент	λ , нм	Диапазон, мкг/мл	Наклон	b	Коеф. корр.	ПрД, мкг/мл	ПрО, мкг/мл
4,6-ДН-5,7-ДХБФО	400	2 – 200	29316	1525	0,9999	0,05	0,16
5-Н-4,6-ДХБФО	400	2 – 100	23122	1213	0,9999	0,04	0,12
ДНТХБ	245	0,5 – 160	17918	506	0,9998	0,17	0,56
ДХТНАБ	245	0,5 - 160	49380	-740	0,9998	0,05	0,16
ДНТХБ	207	0,5 – 160	277401	5026	0,9999	0,01	0,03
ДХТНАБ	207	0,5 - 160	95403	-3274	0,9999	0,03	0,10

**Таблица 7. Результаты хроматографического определения ЛФ
на основе хлорнитропроизводных бензофуроксана (n=4, P=0,95)**

Состав смеси (масс. %)	Найдено компонента, %	S _r
5-Н-4,6-ДХБФО (30,6)	30,3±0,7	0,04
4,6-ДН-5,7-ДХБФО (50,2)	50,4±1,1	0,05
5-Н-4,6-ДХБФО (60,5)	60,4±0,6	0,04
4,6-ДН-5,7-ДХБФО (30,2)	30,1±0,9	0,06
5-Н-4,6-ДХБФО (80,7)	80,2±0,9	0,04
4,6-ДН-5,7-ДХБФО (15,4)	15,2±0,07	0,04
5-Н-4,6-ДХБФО (0,28)	0,26±0,02	0,05
4,6-ДН-5,7-ДХБФО (0,20)	0,19±0,02	0,05
ПЭГ400 (79,7), ПЭГ1500 (16,9), ДМСО (2,8)		
5-Н-4,6-ДХБФО (0,25)	0,24±0,02	0,06
4,6-ДН-5,7-ДХБФО (0,2)	0,22±0,03	0,06
Неонол (1,5), Вазелиновое масло (97,5)		
5-Н-4,6-ДХБФО (0,5)	0,52±0,05	0,05
Моноалкилфениловые эфиры полиэтиленгликоля (1,4)		
Дистиллированная вода (98)		

Таким образом, результаты диссертационной работы демонстрируют высокую эффективность использования разработанного унифицированного подхода к определению широкого ряда лекарственных средств методом ВЭЖХ, что позволяет расширить возможности их контроля качества и обеспечить значительную экономичность фармацевтического анализа.

ВЫВОДЫ

1. Предложены подходы к оптимизации хроматографического разделения ряда метаболитов, химиотерапевтических, анальгезирующих и противовоспалительных лекарственных средств в условиях обращенно-фазной ВЭЖХ на основе применения фосфатного буфера (0,02 М; pH 2,5), растворов трифторуксусной кислоты (0,05%), смеси алкиламинов и фосфорной кислоты (1%; pH 6,7), смеси додецилсульфата натрия (0,01 М) и фосфатного буфера (0,01 М; pH 2,3) как унифицированных подвижных фаз при разделении гидрофильных соединений с ионогенными кислотными и основными функциональными группами.

2. Для разделения водо- и жирорастворимых витаминов, антибиотиков, производных карбоновых кислот и фенолов, гетероциклических аминов, флавоноидов и хлорнитрозамещенных бензофуроксанов следует использовать смеси унифицируемых элюентов с ацетонитрилом и метанолом. Выявлено влияние состава подвижных фаз, их pH, содержания в них неводного компонента, режимов изократического и градиентного элюирования на разделение лекарственных веществ, характеризующееся высокой селективностью (более 1,2), разделяющей способностью (более 2,2), эффективностью (более 4500 теоретических тарелок) и симметрией пика (менее 1,18).

3. Впервые установлены условия разделения и количественного определения 10 водорастворимых витаминов в элюенте на основе смеси 1% раствора диэтиламина, 1% раствора триэтиламина и фосфорной кислоты (pH 6,7) на сорбенте с фазой C18 при высоких коэффициентах удерживания витаминов B₁, B₆, PP (2,89; 3,97; 4,61 соответственно) без традиционного применения ион-парных реагентов. При этом хроматографическая система характеризуется хорошей симметрией пиков (менее 1,2), высокой селективностью (более 1,1) и разрешением (более 3,8 для всех соединений) при времени анализа 25 мин.

4. Одновременное ВЭЖХ определение парацетамола, аскорбиновой и ацетилсалициловой кислот, анальгина, кофеина, дибазола, папаверина, 4-аминофенола с диодно-матричным и флуоресцентным детектированием возможно в сложных по составу лекарственных формах андипала, цитрамона, антигриппина, антиангина и цитрапака.

5. Разработаны подходы по количественному одновременному определению лекарственных веществ, нормируемых примесей и консервантов в смесях на основе винпоцетина, рибоксина, трамадола, а также новых гелей напроксена и теноксикама с ПрО компонентов до 20 нг/мл при прямой инъекции пробы.

6. Предложена схема проведения ВЭЖХ анализа с нитрильными и амидными фазами сложных биологически активных смесей на основе близких по физико-химическим свойствам 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуроксана, 4-нитро-5,7-дихлорбензофуроксана и 5-нитро-4,6-дихлорбензофуроксана, а также исходных и промежуточных компонентов их синтеза с ПрО до 10 нг/мл. Разработанная методика использована для контроля лекарственных форм, препаратов «Димиксан» и

«Тримиксан», а также постадийного контроля процессов нитрования и термоциклизации при их получении.

7. Предложена унифицированная методика идентификации и определения цефазолина, цефатоксима, ципрофлоксацина, амоксициллина, натриевых солей ампициллина и бензилпенициллина, парацетама, рибоксина, бифоназола, флуконазола, тербинафина, диклофенака-натрия, трамадола, позволяющая разделять все соединения в условиях ВЭЖХ на колонке с сорбентом C18 с двухкомпонентной подвижной фазой (фосфатный буфер, 0,02 М; pH 2,5 – ацетонитрил), что существенно повышает экономичность всего анализа.

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК для размещения материалов диссертаций:

1. Салахов, И.А. Определение флавоноидов боярышника в лекарственных формах методом высокоскоростной жидкостной хроматографии / И.А. Салахов, С.Ю. Гармонов // Вестник Казанского технологического университета. - 2007. - №6. - С. 34-36.

2. Гармонов, С.Ю. Количественное определение компонентов антигриппина методом высокоскоростной жидкостной хроматографии / С.Ю. Гармонов, Салахов И.А. // Хим.-фарм. журн. – 2009. – Т. 43, № 11. – С. 56-60.

3. Салахов, И.А. Контроль качества лекарственных форм на основе боярышника методом жидкостной хроматографии высокого давления / И.А. Салахов, С.Ю. Гармонов, И.Е. Зыкова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2009. - №4. - С. 61-63.

4. Салахов, И.А. Контроль качества лекарственного препарата антигриппина методом градиентной ВЭЖХ / И.А. Салахов, С.Ю. Гармонов, Р.Н. Исмаилова, Н.Г. Николаева, С.М. Горюнова // Вестник Казанского технологического университета. - 2009. - №4. - С. 49-53.

5. Эль-Али, Ф.А. Контроль качества лекарственной формы напроксена наружного применения / Ф.А. Эль-Али, Н.М. Насыбуллина, И.А. Салахов // Фармация. – 2009. – №1. – С. 6–8.

6. Эль-Али, Ф.А. Определение теноксикама в лекарственной форме для наружного применения / Ф.А. Эль-Али, Н.М. Насыбуллина, И.А. Салахов // Фармация. – 2009. – №3. – С. 20–23.

Материалы конференций:

1. Гармонов, С.Ю. Аналитические методы в биофармацевтических исследованиях и контроле перекрестного загрязнения химико-фармацевтических производств / С.Ю. Гармонов, Г.Р. Нурисламова, А.В. Яковлева, И.А. Салахов, Н.С. Шитова // Тезисы докл. XVIII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. - М., 2007. - Т.4. - С. 115.

2. Салахов, И.А. Расширение возможностей контроля качества лекарственных препаратов при использовании систем градиентной ВЭЖХ/ И.А. Салахов,

С.Ю. Гармонов // Тезисы докл. III Всероссийской конференции «Аналитические приборы». - С.-Петербург, 2008. - С. 31.

3. Салахов, И.А. Определение лекарственных веществ и посторонних примесей в лекарственных формах методом градиентной ВЭЖХ / И.А. Салахов, С.Ю. Гармонов // Тезисы докл. Всероссийской конференции «Химический анализ». - М., 2008. - С. 121-122.

4. Салахов, И.А. Повышение эффективности обеспечения безопасности лекарственных средств на этапе контроля их качества / И.А. Салахов, С.Ю. Гармонов // Тезисы докладов XV Рос. нац. конгресса "Человек и лекарство", - М., 2008. - С. 561-562.

5. Салахов, И.А. Расширение возможностей ВЭЖХ в контроле качества лекарственных средств / И.А. Салахов, С.Ю. Гармонов // Материалы II Международного форума «Аналитика и аналитики». - Воронеж, 2008. - Т. 2. - С. 528.

6. Салахов, И.А. Контроль качества лекарственных средств: расширение возможностей при использовании градиентной ВЭЖХ / И.А. Салахов, Г.Р. Нурисламова, С.Ю. Гармонов // Тезисы докл. Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии». - Самара, 2009. - С. 190.

7. Гармонов, С.Ю. Возможности фармацевтического анализа при использовании градиентной ВЭЖХ / С.Ю. Гармонов, И.А. Салахов, Г.Р. Нурисламова, Л.М. Юсупова // Тезисы докл. III Всероссийской конференции с межд. участием "Аналитика России". - Краснодар, 2009. - С. 62.

8. Гармонов, С.Ю. Оптимизация контроля лекарственных средств и химико-фармацевтического производства при использовании ВЭЖХ / С.Ю. Гармонов, И.А. Салахов, Г.Р. Нурисламова // Тезисы докл. I Всероссийской конференции "Современные методы химико-аналитического контроля фармацевтической продукции". - Москва, 2009. - С. 54-55.

9. Гармонов, С.Ю. Определение витаминов в лекарственных средствах и биологически активных добавках методом ВЭЖХ / С.Ю. Гармонов, И.А. Салахов, Г.Р. Нурисламова // Тезисы докл. 65-ой Всероссийской конференции по фармации и фармакологии. - Пятигорск, 2010. - С. 78.

Соискатель



Салахов И.А.

Отпечатано в ООО «Печатный двор».
г. Казань, ул. Журналистов, 1/16, оф. 207
Тел: 272-74-59, 541-76-41, 541-76-51.
Лицензия ЦД №7-0215 от 01.11.2001 г.
Выдана Поволжским межрегиональным
территориальным управлением МПТР РФ.
Подписано в печать 15.05.2010 г. Печ.л. 1,4
Заказ № К-6887. Тираж 100 экз. Формат 60х84 1/16.
Бумага офсетная. Печать - разграфлен.